

⑩ 日本国特許庁(J.P.)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-130091

⑬ Int. Cl.⁹
C 12 P 21/02

識別記号

C

庁内整理番号

8214-4B
8717-4B
6807-4B

⑭ 公開 平成3年(1991)6月3日

C 12 N 15/00
5/00

A
B※

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全20頁)

⑮ 発明の名称 組換ヒト肝実質細胞増殖因子

⑯ 特 願 平1-142697

⑰ 出 願 平1(1989)6月5日

⑱ 発 明 者 中 村 敏 一 福岡県福岡市東区大字名子870番地の107
⑱ 発 明 者 萩 屋 道 雄 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬
研究所内
⑱ 発 明 者 西 澤 勉 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬
研究所内
⑱ 発 明 者 関 達 也 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬
研究所内
⑲ 出 願 人 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
⑲ 出 願 人 中 村 敏 一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号
⑲ 代 理 人 弁理士 高 島 一
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

組換ヒト肝実質細胞増殖因子

2. 特許請求の範囲

(1) 組換ヒト肝実質細胞増殖因子。

(2) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を含有するDNA。

(3) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発現し得る組換発現ベクター。

(4) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発現し得る組換発現ベクターにより形質転換された形質転換体。

(5) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発現し得る組換発現ベクターにより形質転換された形質転換体を培養し、該培養液から組換ヒト肝実質細胞増殖因子を採取することを特徴とする組換ヒト肝実質細胞増殖因子の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は肝実質細胞増殖活性を有するポリペプ

チド、さらに詳しくは、生体外(in vitro)で肝実質細胞の維持、増殖を可能にする生理活性を有する新規なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、組換発現ベクター、形質転換体、および該ポリペプチドの製造法に関するものである。

本発明のポリペプチドは肝実質細胞培養試薬、肝再生促進剤、肝機能の基礎的研究、肝実質細胞に対する各種ホルモンや薬剤の作用の研究、肝癌の免疫研究用、さらに該ポリペプチドに対する抗体を用いる臨床診断試薬、肝疾患治療薬などへの利用が期待出来る。

(従来の技術)

従来、細胞増殖活性を有するポリペプチドとして、上皮細胞増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、神経細胞増殖因子(NGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内皮細胞増殖因子(ECGF)などが知られている。これらの細胞増殖因子の他に、生体外において肝実質細胞増殖活性を有するポリペプチドが1984年

⑩ 日本国特許庁(J.P.)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-130091

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)6月3日

C 12 P 21/02

C

8214-4B

8717-4B

6807-4B

C 12 N 15/00

5/00

A

B※

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全20頁)

⑮ 発明の名称 組換ヒト肝実質細胞増殖因子

⑯ 特 願 平1-142697

⑰ 出 願 平1(1989)6月5日

⑱ 発 明 者 中 村 敏 一 福岡県福岡市東区大字名子870番地の107
⑱ 発 明 者 萩 屋 道 雄 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬
研究所内
⑱ 発 明 者 西 澤 勉 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬
研究所内
⑱ 発 明 者 関 達 也 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬
研究所内
⑲ 出 願 人 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
⑲ 出 願 人 中 村 敏 一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号
⑳ 代 理 人 弁理士 高 島 一

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

組換ヒト肝実質細胞増殖因子

2. 特許請求の範囲

(1) 組換ヒト肝実質細胞増殖因子。

(2) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を含有するDNA。

(3) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発見し得る組換発現ベクター。

(4) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発見し得る組換発現ベクターにより形質転換された形質転換体。

(5) ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発見し得る組換発現ベクターにより形質転換された形質転換体を培養し、該培養液から組換ヒト肝実質細胞増殖因子を採取することを特徴とする組換ヒト肝実質細胞増殖因子の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は肝実質細胞増殖活性を有するポリペプ

チド、さらに詳しくは、生体外(in vitro)で肝実質細胞の維持、増殖を可能にする生理活性を有する新規なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、組換発現ベクター、形質転換体、および該ポリペプチドの製造法に関するものである。

本発明のポリペプチドは肝実質細胞培養試薬、肝再生促進剤、肝機能の基礎的研究、肝実質細胞に対する各種ホルモンや薬剤の作用の研究、肝癌の発癌研究用、さらに該ポリペプチドに対する抗体を用いる臨床診断試薬、肝疾患治療薬などへの利用が期待出来る。

(従来の技術)

従来、細胞増殖活性を有するポリペプチドとして、上皮細胞増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、神経細胞増殖因子(NGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内皮細胞増殖因子(ECGF)などが知られている。これらの細胞増殖因子の他に、生体外において肝実質細胞増殖活性を有するポリペプチドが知られる。

に中村らによって再生肝ラット血清より部分精製され、肝実質細胞増殖因子(以下HGFと略す)と命名された。

このHGFの発見まで肝実質細胞は、各種の株化細胞が活発に増殖する哺乳動物血清の存在下でも該細胞の増殖が全く認められず、通常約1週間で培養容器の壁からの脱落が起こり、生体外での長期培養は不可能であった。ところが、このHGFの存在下において肝細胞は極めて良好に増殖し、該細胞の培養が可能となった(Biochem. Biophys. Res. commun., 122, 1450, 1984)。他の研究者によっても、このHGF活性は、肝部分切除手術後の血中、劇症肝炎患者の血中にも存在することが確認された。その後、多くの研究者によって精製法、化学的性質、生物学的性質が明らかにされたが、このHGFあるいはHGFと同様の肝細胞増殖活性を有するポリペプチドのアミノ酸構造を同定するまでには至らなかった。

このような状況の下で、本発明者らは、先にラット血小板からHGFを分離精製して研究を重ね、

この血小板由来のHGFは、2種のサブユニットからなり、このHGFは生体外において肝実質細胞を極めて良好に増殖させることを見出すとともにHGFに含有される一部のアミノ酸配列27残基を同定することに成功した(特願昭63-311866号公報)。

(発明が解決しようとする課題)

生体内HGFは、肝組織あるいは血小板などから極微量分泌されるポリペプチドであるため、原料組織の入手、HGFの収量、安定供給など問題点が多い。このHGFを肝実質細胞の培養や肝細胞の研究用として利用するためには、その構造を明らかにしHGFあるいはHGFと同様な活性を有するポリペプチドを遺伝子組換技術を用いて大量に供給することが望まれている。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、ラット肝臓mRNAより調製したcDNAライブラリーより、ラット血小板由来のHGFのアミノ酸配列に基づいて合成したオリゴ

ヌクレオチドをプローブとして用い、ラットHGFβ鎖ポリペプチドをコードする塩基配列を含有するcDNAが得られることを見出した。さらに、ラット由来の該cDNAの全部あるいはその一部をプローブとして、ヒト肝臓mRNAより調製されたcDNAライブラリーよりヒトHGFポリペプチドをコードする塩基配列を含有するcDNAが得られることを見出した。さらに、該cDNAを含有する組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体、該形質転換体を培養してヒトHGF遺伝子が発現することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は組換えヒト肝実質細胞増殖因子、ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を含有するDNA、該DNAを発現し得る組換え発現ベクター、および該組換え発現ベクターで形質転換された形質転換体、および該形質転換体を培養し、該培養物から組換えヒト肝実質細胞増殖因子を採取・製造する方法である。

本発明のヒト肝実質細胞増殖因子をコードする

DNA、組換え発現ベクター、および形質転換体は、例えば次のようにして調製される。

すなわち、(1)ラット肝細胞やラット巨核球などの動物組織よりmRNAを単離し、常法に従ってcDNAライブラリーを作製し、(2)合成オリゴヌクレオチドプローブ、あるいは抗体を用いてラットHGFのcDNAを単離するため、上記ラット由来cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローンより目的とするcDNAを抽出し、このラット由来HGFのcDNAをプローブとして、ヒト肝mRNAより調製したcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローンより目的とするヒト由来HGFのcDNAを抽出する。(3)このヒト由来HGFのcDNAよりヒトHGFをコードするcDNA断片を制限酵素を用いて切り出し発現用ベクターに組み込み、(4)得られた組換え発現ベクターにより宿主細胞を形質転換して形質転換体を得、(5)この形質転換細胞を培養して、その培養上清から本発明のヒトHGFを採取・製造することが出来る。さら

に形質転換細胞中の組換え発現ベクターから制限酵素処理によって本発明のヒトHGFをコードする塩基配列を含有するDNAを得ることが出来る。

以下、本発明の各工程について詳細に説明する。

(1) mRNAの単離とcDNAライブラリーの調製：

ラットまたはヒトのHGFをコードするmRNAはラット巨核球細胞、ラットまたはヒト肝組織などから各々得ることが出来る。例えば、Biochemistry, 18, 5294 (1979) に記載されているJ. M. Chirgwinらの方法によって、ラット巨核球細胞、またはラットもしくはヒト肝組織のグアニジンチオシアン酸溶液から得たRNAをさらにオリゴ(dT)セルロースカラムを用いる液体クロマトグラフィーに付すことによって該mRNAを調製することが可能である。

また、ヒト肝mRNAのような動物細胞や動物組織などの各種mRNAは、市販品としてクロンテック社などから購入して利用することも出来る。

これらのmRNAを鋳型として逆転写酵素を用いて、例えばM. Okayamaらの方法(Mol. Cell.

Biol., 2, 161, 1982、およびMol. Cell. Biol., 2, 280, 1983)あるいはL. Gublerらの方法(Gene, 25, 263, 1983)に従ってcDNAを合成し、このcDNAをプラスミドやファージなどに組み込むことによりcDNAライブラリーを調製することが出来る。cDNAを組み込むプラスミドベクターとしては、大腸菌由来のpBR322(東洋紡績)、pUC18およびpUC19(東洋紡績)、枯草菌由来のpUB110(シグマ社)などがある。またcDNAを組み込むファージベクターとしては、 λ gt10および λ gt11(東洋紡績)などがある。これらのベクターは、宿主細胞内に保持されて複製、増幅されるものであれば、ここに例示したものに限定されるものではない。

mRNAを鋳型として合成されたcDNAをプラスミドまたはファージに組み込んでcDNAライブラリーを調製する方法として、T. Maniatisの方法(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 239)またはT. V. Nguyenらの方法(DNA Cloning: A Practical Approach,

1, 49, 1985)を各々例示することが出来る。また、mRNAと同様に各種のcDNAライブラリーを市販品としてクロンテック社などから購入することが出来るのでそれらを利用することも出来る。

(2) cDNAライブラリーのクローニング：

cDNAライブラリーとして得られたプラスミドやファージなどの組換え発現ベクターは、大腸菌のような適切な宿主細胞に保持される。宿主となり得る大腸菌としては、例えばEscherichia coli NM514, C600(ストラタジーン社)、NM522, JM101(ファルマシア社)などを例示することが出来る。cDNAのベクターがプラスミドの場合、塩化カルシウム法、塩化カルシウム・塩化ルビジウム法などを用いて、またcDNAのベクターがファージの場合、インビトロパッケージング法などを用いてあらかじめ増殖させた宿主細胞に保持させることが出来る(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 249)。

このようにして得られた形質転換体から、ラッ

ト肝実質細胞増殖因子の部分のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドを合成し、このオリゴヌクレオチドを³²P標識したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーション法(Gene, 10, 63, 1980)、ブランクハイブリダイゼーション法(Science, 195, 180, 1977)などによってcDNAクローンを釣り上げることが出来る。また、目的とするポリペプチドに対する抗体を用いて、免疫抗体法(DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49, 1985)によって、cDNAクローンをクローニングすることも可能である。このようにしてクローン化された形質転換体は、ラット由来HGFの全アミノ酸配列あるいはその部分のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するcDNAを含有している。

次に該形質転換体から常性(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982)に従ってプラスミドやファージなどの組換えDNAを単離し、そのまま、あるいは制限酵素で消化してからcDNA塩基配列が決定される。最初に該

られたラット由来cDNAをプローブとして、ラットとヒトの間のcDNA塩基配列のホモロジーを利用して、同様の方法によってヒト肝由来mRNAから調製されたcDNAライブラリーのクローニングを行うことが出来る。得られたラットあるいはヒト由来HGFのcDNAの塩基配列は、マクサムとギルバートの化学法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977)やサンガーのジデオキシ法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977)などによって決定される。さらに、必要があれば、記述のmRNAと塩基配列の決定されたcDNAの1部あるいはcDNAの1部の合成DNAをプライマーにしてプライマーエクステンション法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 731, 1979)によって新たにcDNAを合成し、上記と同様にしてcDNAライブラリーから第1のcDNAに連結した第2のcDNAを含有するプラスミドやファージなどの組換えDNAをクローニングすることが可能である。このプライマーエクステンションとクローニングの工程は、必要によ

り複数回繰り返される。

(3) ヒトHGF組換え発現ベクターの構築:

クローン化されたヒトHGFのアミノ酸配列の全部あるいはその一部をコードするcDNAを含有する数種のプラスミドやファージなどの組換えベクターから制限酵素によってcDNAを切り出し、ヒトHGFの発現に適したベクターのプロモーターの下流に制限酵素とDNAリガーゼを用いて再結合して組換え発現ベクターを作製することが出来る。

より詳しくは、本発明のヒトHGFを効率良く発現させるために組換え発現ベクターは転写の下流方向に順番に必要により(1)プロモーター、(2)リボソーム結合部位、(3)開始コドン、(4)本発明のヒトHGFをコードする塩基配列を含有するDNA、(5)終止コドン、(6)ターミネーターを含むように構築される。

本発明で用いることが出来るDNAのベクターとして、大腸菌由来のプラスミドpBR322、pUC18(東洋紡績)、枯草菌由来のプラスミ

ドpUB110(シグマ社)、酵母由来のプラスミドpRB15(ATCC37062)、バクテリオファージ λ gt10、 λ gt11(ストラタジーン社)、ウイルスSV40(BRL社)、BPV(ATCC VR-703)、レトロウイルスの遺伝子由来のベクターなどが列挙出来るが宿主内で複製・増幅可能なベクターであれば特に限定はない。特に、本発明のヒトHGFを簡便に発現させるには、SV40のようなウイルスの遺伝子由来のベクターを用いるのが好ましい。

例えば、前述のクローン化されたヒトHGFをコードするDNAをSV40ベクターの後期領域に結合した組換え発現ベクターは、COS細胞(Cell, 23, 175, 1981)と呼ばれるサル細胞株に導入して発現させることが可能である。

プロモーターおよびターミネーターに関しても、目的とするヒトHGFをコードする塩基配列の発現に用いられる宿主に対応したものであれば特に限定はない。例えば、プロモーターとして、宿主が大腸菌である場合、 λ Pプロモーター、 λ a

cプロモーターなどを、宿主が枯草菌である場合、SP01プロモーター、SP02プロモーターなどを、宿主が酵母である場合、GAPプロモーター、PGKプロモーターなどを、宿主がマウス線維芽細胞やチャイニーズハムスター卵巣細胞のような動物細胞の場合、ウイルス由来のSV40プロモーター、HSV1-TKプロモーターなどを例示することが出来る。またターミネーターとしては、宿主が大腸菌の場合、 λ r pターミネーター、 λ p pターミネーターなどを、宿主が枯草菌の場合、amy Fターミネーターなどを、宿主が酵母の場合、CYC1ターミネーターなどを、宿主が動物細胞の場合、SV40ターミネーター、HSV1-TKターミネーターなどを例示することが出来る。これらのプロモーターとターミネーターは用いる宿主に応じて適切に組み合わせられる。

本発明のヒトHGFをコードする塩基配列を含有するDNAは、そのDNAが発現されるポリペプチドが、肝実質細胞増殖活性を有するならば特に制限はなく、例えば後述する第4図に示した塩

基配列が例示され、さらには上記塩基配列の一部が置換、欠損、挿入、あるいはこれらが組み合わされた塩基配列を有するDNAであってもよい。本発明のヒトHGFをコードする塩基配列を含有する該DNAの翻訳開始コドンとしてATG、翻訳終了コドンとしてTAA、TGA、あるいはTAGを有してもよい。また必要に応じて開始コドン、あるいは終了コドンをもつ以上組み合わせたり、他のコドンと組み合わせて配列してもよく、これらに特に限定はない。さらに、この組換え発現ベクターで形質転換した宿主の選択マーカーとなり得るアンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子など1種または2種以上が該ベクターの適切な位置に含有されていることが好ましい。

(4) 宿主細胞の形質転換とその培養：

このようにして構築されたヒトHGF組換え発現ベクターは、コンピナント細胞法(J. Mol. Biol., 53, 154, 1970)、プロトプラス法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, 1978)リン酸カルシ

ウム法(Science, 221, 551, 1983) DEAEデキストラン法(Science, 215, 166, 1982)、電気パルス法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7161, 1984)、インビトロパッケージング法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 581, 1975)、ウイルススペクター法(Cell, 37, 1053, 1984)、またはマイクロインジェクション法(Exp. Cell. Res., 152, 347, 1984)などによって宿主に導入され、形質転換体が作製される。このとき、宿主として既述の大腸菌の他に、枯草菌、酵母、動物細胞などが用いられる。特にマウス線維芽細胞C127(J. Virol., 25, 291, 1978)やチャイニーズハムスター卵巣細胞CHO(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216, 1980)などの哺乳動物由来の宿主細胞を用いるのが好適である。

得られた形質転換体は、目的とする組換えヒトHGFを産生させるためにその宿主に応じた適切な培地中で培養される。培地中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物、ビタミン、血清および薬剤などが含有される。培地の1例と

しては、形質転換体の宿主が大腸菌の場合、LB培地(日本製薬)M9培地(J. Exp. Mol. Genet., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972, p.431)などを、宿主が酵母の場合、YEPD培地(Genetic Engineering, vol. 1, Plenum Press, New York, 1979, p.117)などを、宿主が動物細胞の場合、20%以下のウシ胎児血清を含有するMEM培地、DMEM培地、RPMI1640培地(日本製薬)などを挙げることが出来る。形質転換体の培養は、通常20℃～45℃、pHは5～8の範囲で行われ、必要に応じて通気、攪拌が行われる。また、宿主が接着性の動物細胞などの場合は、ガラスビーズ、コラーゲンビーズ、あるいはアセチルセルロースフェローファイバーなどの担体が用いられる。これら以外の培地組成あるいは培養条件下でも形質転換体が生育すれば実施でき、これらに限定されるものではない。

(5) ヒトHGFの精製：

このようにして形質転換体の培養上清中または形質転換体中に生成した組換えヒトHGFは、公知

の塩析法、溶媒沈殿法、透析法、膜外濾過法、ゲル電気泳動法、あるいはゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィなどを組み合わせて分離精製することが出来る。特に、硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィ、ヘパリンセファロースアフィニティクロマトグラフィ、およびフェニルセファロース逆相クロマトグラフィの組み合わせ、あるいは硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィ、および抗HGF抗体セファロースアフィニティクロマトグラフィの組み合わせなどが好ましく有効な精製法である。

以上述べた方法によって得られた新規な組換えヒトHGFは、ラット肝およびラット血小板由来HGFと同様にラット肝実質細胞の増殖を顕著に促進する活性を示した。

(HGF活性の測定)

HGF活性は、Proc. Natl. Acad. Sci. USA

80, 7229 (1983) に記載の方法に準じて次のように測定した。ウイスター系ラットからコラーゲン濾法によって肝実質細胞を分離精製した。得られたラット肝実質細胞を5%ウシ血清、 2×10^{-4} M インスリンおよび 2×10^{-4} M デキサメサゾンを加えたウイリアムスE培地（フローラボラトリー社）に懸濁し、24ウエルマルチプレートに 1.25×10^4 個/ウエルの濃度で播いた。5% CO₂、および30% O₂、および65% N₂の存在下、37℃で20時間培養後、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアプロチニンを添加したウイリアムスE培地に交換すると同時に所定量の被験試料を添加した。15時間後、 $1.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^{33}P -デオキシウリジン $10 \mu\text{M}$ /ウエルを添加した。コントロール群には、 ^{33}P -デオキシウリジン添加の15分前に $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアフィディコリンを添加した。さらに6時間培養して ^{33}P でラベルした。細胞をpH 7.4のPBSで2回洗浄後、冷10%トリクロロ酢酸水溶液（TCA）で固定した。細胞を1ウエル当たり0.5 mlの1N水酸化ナトリウム水溶液で

可溶化し、その放射能をガンマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の一部をとってローリー法（J. Biol. Chem., 183, 265, 1951）に従い蛋白量を測定した。被験試料を添加したとき肝実質細胞に取り込まれた ^{33}P の量をコントロールとのカウントの差として求め、これをラット肝実質細胞蛋白質1mgあたりに換算して、DNA合成活性（dpm/mg蛋白質）とした。被験試料のHGF活性は、同一試験において上皮細胞成長因子（EGF） $10 \text{ ng}/\text{ml}$ を用いた時の肝実質細胞のDNA合成活性の50%に相当する活性を1単位と定義して表示した。

〔発明の効果〕

本発明によれば、肝実質細胞の生体外での増殖を可能とする新規な生理活性ペプチドが提供される。本発明の組換ヒトHGFは、臨床診断試薬や肝疾患治療薬として有用である。さらに本発明の組換ヒトHGFの作用により増殖維持される肝実質細胞は、例えば肝機能の基礎的研究用、肝実質細胞に対する各種ホルモンや薬剤の作用の研究用、

肝癌の発癌研究用、あるいは肝炎ウイルスの生体外培養のための宿主細胞として極めて有用である。

以下、本発明を実施例により、さらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例〕

実施例1

(1) ラット肝臓mRNAの単離：

ラット肝臓mRNAは、グアニジンチオシアン酸法（Biochemistry, 18, 5294, 1979）によって抽出し、オリゴdTセルロースカラムクロマトグラフィー法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1408, 1972）によって精製して調製した。市販食用植物油で希釈した20%四塩化炭素をSDラット100g当たり1mlを腹腔内投与した。四塩化炭素投与の10時間後、肝臓を抽出した。得られたラット肝臓0.90gに5.5Mグアニジウム溶液（5.5Mグアニジンチオシアン酸、2.5mMクエン酸、0.5%ラウリルサルコシナトリウムからなるpH7.0の溶液）16mlを加えてホモジナイズ

した。0.5M EDTAを含むセシウムトリフロロ酢酸溶液（13.4g/ml）17mlに上記のラット肝分散液16mlを重層し、ベックマン超遠心機、LB-55型によって85000G、22時間、22℃の条件下で遠心分離した。DNA層を除去した後、沈降したRNA層を1mlの滅菌した蒸留水に溶解した。このRNA水溶液から冷エタノール沈降によって6.24mgのRNAを得た。得られたRNAを水溶液中で65℃、5分、加熱処理した後、1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液、pH7.5（以後TE緩衝液と略す）、0.5mlに溶解した。0.1N NaOHで活性化した後、0.5M NaClおよび1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液（STE緩衝液と略す）で平衡化したオリゴdTセルロースカラムにRNA溶液0.5mlを注入した。約5mlのSTE緩衝液で洗浄後、TE緩衝液で吸着したポリ（A）RNAを抽出した。このポリ（A）RNA溶液500μlから冷エタノール沈降で得られたポリ（A）RNAは、再びTE緩衝液に溶解し、1μg/μlと

ロニット肝由来のcJUNライブラリーの作成

クロホルムを加えたSE緩衝液(100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, および0.01%ゼラチンを含む20 mMトリス塩酸緩衝液、pH 7.5)中、4℃で保存した。

特願昭63-311866号公報に記載のラットHGFβ鎖N末端アミノ酸配列15個をコードする塩基配列を推定し、オリゴヌクレオチド

をDNAシンセサイザー381A(アブライドバイオシステムズ社)により合成した。得られたオリゴヌクレオチドをT4ポリヌクレオチドキナーゼ(東洋紡績)を用いて〔 32 P〕ATP(アマシューム社)により標識してDNAプローブを作製した。

上記(2)で得られた約 5×10^3 個の組換ファージ

ジを37℃で15分間約 8×10^8 個の大腸菌N
 M514（ストラタジーン社）に感染させた後、
 約50℃に加温した0.7%の寒天を含むLB培地
 270 mlに添加し、2.3 cm \times 2.3 cmのLB寒天培
 地プレート6枚に均一に流延した。空气中、37
 ℃で12時間培養後、ブラックの生じたプレート
 上にニトロセルロースフィルターを約30秒間密
 着させた。このニトロセルロースフィルターを
 1.5 M NaClおよび0.1 N NaOHからなる
 アルカリ溶液に5分間浸漬し、さらに0.2 M
 トリス塩酸緩衝液（pH7.5）、2.5 mMリン酸緩
 衝液（pH7.5）、2 mM EDTAおよび2 \times S
 SC緩衝液からなる中性液に15分間浸漬した。
 風乾後、80℃で2時間熱処理してニトロセル
 ロースフィルターに各ブラックのDNAを固定化し
 た。得られたニトロセルロースフィルターは、6
 \times SSC緩衝液、5 \times デンハート溶液、50 mM
 PIPES、および100 mMリン酸緩衝液、pH
 7.0、からなるハイブリダイゼーション溶液に浸
 漬し、65℃で5時間前処理した。100℃で5

分間熱処理した上記(3)の 32 P標識合成オリゴヌクレオチド(約 3×10^4 c.p.m)プローブとサケ精巣DNA(0.1 μ g/ μ l)の混合液を添加し、45 $^{\circ}$ Cで16時間ハイブリダイゼーション反応を行った。反応後、ニトロセルロースフィルターは50 $^{\circ}$ Cで0.1% SDSを含む6 \times SSC緩衝液によって3面洗浄してから固定した。このニトロセルロースフィルターを増感スクリーン、ライティングプラス(デュボン社)とX線フィルム、RX(富士写真フィルム)に密着させ、-80 $^{\circ}$ Cで30時間露光した。得られた3個の陽性ブランクを採取し、上記と同じ方法によって2次スクリーニングを行い、得られた1個の陽性クローンをRBC1と命名した。このRBC1ファージを常法により増殖させ、RBC1 cDNAを単離精製した。得られたcDNAの塩基配列は、シーケンス(ユナイテッド ステート バイオケミカル社)を用いてジデオキシ法によって決定した。第1図にRBC1 cDNAの全塩基配列を示す。RBC1 cDNAは、ラットHGF β 鎖をコードする塩

基配列(1番目から699番目)を含有する。得た。HBC25ファージから常法により単離、精製したHBC25 cDNAを塩基配列解析および制限酵素切断解析に供した。第2図(左)にHBC25 cDNAの制限酵素地図、第3図(左)にHBC25 cDNAの塩基配列の一部を示す。次にHBC25 cDNAに含有する 32 P-TCATTAATCTTTCAAGTCTTの塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをDNAシンセサイザー381A(アプライドバイオシステムズ社)により合成した。この合成DNA 0.75 μ gをプライマーとし、ヒト肝mRNA 20 μ gを鋳型としてcDNA 0.4 μ gを合成し、同様にしてcDNAライブラリー(II)を調製した。このcDNAライブラリー(II)から 32 P-dCTPで標識したHBC25 cDNAの0.7 kb EcoRI断片をプローブにして陽性クローンHAC19を得た。第2図(右)にHAC19 cDNAの制限酵素地図、第3図(右)にHAC19 cDNAの塩基配列の一部を示す。このようにして得られたHBC25 cDNAおよびHAC19 cDNAの塩基配列を組み合わ

基配列(1番目から699番目)を含有する。

(5)ヒトHGF遺伝子DNAの単離と塩基配列の決定:

ヒト正常肝臓mRNA(クロンテック社)5 μ gを鋳型にして上記(2)と同様にしてヒト肝由来のcDNAを合成した。1本鎖cDNAの収量は、1100 ngであった。得られたcDNAの200 ngをアガロース電気泳動に供し、分画した4~7 kbのcDNAをジーンクリーン(バイオ101社)で抽出した後、上記(2)と同様にしてcDNAライブラリー(I)を調製した。cDNA 1 μ gから 2×10^4 個の超換ファージを得た。マルチプライムDNA複製システム(アマシュー社)を用いて 32 P-dCTPで標識したRBC1 cDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーション反応温度および洗浄温度を60 $^{\circ}$ C、洗浄液は1+0.1% SDSを含む2 \times SSC緩衝液とした以外は(4)と同様に、ヒト肝由来cDNAライブラリー(I)の1次スクリーニングおよび2次スクリーニングを行い、陽性クローンHBC25

せたヒトHGFコード領域の全塩基配列およびその塩基配列から推定されるアミノ酸配列を第4図に示す。ヒトHGFの全cDNA塩基配列から、ヒトHGFの翻訳開始コドンは1番目のATGであり、終止コドンは2185番目のTAGと推定される。これらの開始および終止コドンの間のヒトHGFのcDNA塩基配列は728アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードし、1番目のMetに続くアミノ酸配列はLeuに富み、29番目のAlaまでがHGF分泌のためのシグナル配列と推定される。ヒトHGF α 鎖のN末端は、ラットHGF α 鎖のアミノ酸配列との類似性から55番目のProと推定される。同様にヒトHGF β 鎖のN末端は、495番目のValと推定される。また、ヒトHGFの糖鎖の結合部位は、Asn-X-Ser/Thrのアミノ酸配列を有する294番目、402番目、566番目、および653番目のAsnと推定される。

(6)サルCOS細胞用ヒトHGF発現ベクターの構築:

サルCOS細胞用ヒトHGF発現ベクターpEUK (hHGF I) の構築図を、第5図に示す。上記(5)で得られたHAC19ファージDNAを制限酵素BamHIとScaIで消化し、アガロース電気泳動により0.9 kbのDNA断片を分離・精製した。同様にHBC25ファージDNAを制限酵素ScaIとSmaIで消化し、2.1 kbのDNA断片を分離・精製した。これらのDNA断片をあらかじめ制限酵素BamHIとSmaIで消化したブルースクリプトKSM13+ (ストラタジーン社) と混合し、T4 DNAリガーゼで結合してプラスミドpBS (hHGF I) を得た。得られたpBS (hHGF I) を制限酵素XbaIとSmaIで消化した。制限酵素XbaIとSmaIであらかじめ消化したCOS細胞用発現ベクターpEUK-C1 (クロンテック社) と3.0 kb DNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼで結合してヒトHGF発現ベクターpEUK (hHGF I) を得た。

(7) サルCOS細胞の形質転換とヒトHGF遺伝子

の発現:

得られたpEUK (hHGF I) プラスミドをエタノール沈殿した後、1.0 mM PBS緩衝液に溶解し、2 μ g/ μ lに調整した。次に、1.0ウシ胎児血清 (ギブコ社) を含むDMEM培地 (日本製薬) 中で飽和細胞密度まで増殖させたCOS-1細胞 (ATCC CRLE-1650) を1.0 mM PBS緩衝液で2回洗浄した後トリプシン処理した。同緩衝液で3回洗浄後、細胞濃度 2×10^6 個/ μ lになるように再び同緩衝液に浮遊化した。先に調整したプラスミド溶液250 μ lと細胞浮遊液250 μ lを混合し、氷冷下で10分間放置した。この氷冷したプラスミド・細胞混液に高電圧パルス遺伝子導入装置Z-A-1200 (PDS社) を用いて、印加電圧4 kV/cm、パルス時間20ミリ秒の条件下で高電圧パルスをかけた。得られた細胞を上記の培地で希釈し、37℃、5% CO₂存在下にて3日間培養した。培養3日目の培養上清中のHGF活性を前述のラット肝実質細胞を用いて測定したところ、5.0単位/ μ lであっ

た。

一方、HGF cDNAを挿入していない発現ベクター、pEUK-C1を同じ方法によりCOS-1細胞に導入して培養したが、その培養上清中には、HGF活性を認めなかった。

実施例2

(1) マウスC127細胞用ヒトHGF発現ベクターの構築

マウスC127細胞用ヒトHGF発現ベクターpBPM T (hHGF II) の構築図は、第6図に示す。実施例1で得られたHAC19ファージDNAを制限酵素BamHIとScaIで消化し、アガロース電気泳動により0.9 kbのDNA断片を分離・精製した。同様にHBC25ファージDNAを制限酵素ScaIとPstIで消化し、2.1 kbのDNA断片を分離・精製した。これらのDNA断片をあらかじめ制限酵素BamHIとPstIで消化したブルースクリプトKSI+ (ストラタジーン社) と混合し、T4 DNAリガーゼで結合してプラスミドpBS (hHGF II) を得た。

プラスミドpBPM Tを制限酵素EcoRVで消化後、細菌性アルカリファスファターゼ (BAP) でリン酸基を除去した部位に、プラスミドpBS (hHGF II) を制限酵素XbaIとSmaIとNaeIで消化しT4 DNAポリメラーゼで平滑末端とした後、アガロース電気泳動により分離・精製した3.0 kbのDNA断片をT4 DNAリガーゼにより挿入した。得られたヒトHGF発現ベクターpBPM T (hHGF II) は、MT-1プロモーターとSV40初期遺伝子のポリ(A)付加シグナルの間にヒトHGF遺伝子を有し、この発現ベクターによるマウスC127細胞の形質転換は、ウシバビロウイルス (BPV) により行われる。また形質転換された細胞の選択は、トランスポゾンTn5のneo遺伝子 (Gene, 19, 327, 1982) にヘルペスシンプレックスウイルスタイプ1のチミジンキナーゼ (HSV-1 TK) 遺伝子由来のプロモーターとポリ(A)付加シグナルを連結したneoキメラ遺伝子によって可能となる。

(2) マウス C127 細胞の形質転換とヒト HGF 遺伝子の発現:

ヒト HGF 発現ベクター pBPM-T(hHGF II) は、Wigler らの方法 (Cell, 21, 223, 1977) によりマウス C127 細胞へ導入した。

上記 (1) で得られた $2.0 \mu\text{g}$ の pBPM-T(hHGF II) プラスミドを $240 \mu\text{l}$ の 0.5 M 塩化カルシウム $240 \mu\text{l}$ に溶解し、 20 mM HEPES、 280 mM NaCl および 1.5 mM リン酸ナトリウムからなる $2 \times \text{HEPES}$ 緩衝液 ($\text{pH} 7.1$)、 $240 \mu\text{l}$ を攪拌しながら加えた。室温で 30 分攪拌を続けプラスミドとリン酸カルシウムの共沈澱を形成させた。あらかじめ、10% ウシ胎児血清 (ギブコ社) および 10 mM グルタミンを添加した DMEM 培地 (日本製薬) を用いて 5×10^5 個の C127 細胞を 5% CO₂ の存在下で 37°C で、24 時間培養した。培地交換した後、プラスミドとリン酸カルシウム共沈澱を加え、室温で 20 分放置した。さらに 37°C で 4 時間インキュベートした後、培地を除去し、15%

HGF II を制限酵素 XbaI と SalI と NaeI で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平末端とした後、アガロース電気泳動により分離・精製した 3.0 kb の DNA 断片を T4 DNA リガーゼにより挿入した。得られたヒト HGF 発現ベクター pEVM-T(hHGF II) は、MT-1 プロモーターと SV40 の初期遺伝子のポリ(A)付加シグナルの間にヒト HGF 遺伝子を有する。また、形質転換された細胞の選択は、マウス DHFR 遺伝子に SV40 初期プロモーターとポリ(A)付加シグナルを連結した DHFR キメラ遺伝子により可能となる。

(2) チャイニーズハムスター CHO 細胞の形質転換とヒト HGF 遺伝子の発現:

ヒト HGF 発現ベクター pEVM-T(hHGF II) は、実施例 2 と同様にしてチャイニーズハムスター CHO 細胞のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 欠損 CHO-DUKX 細胞に導入した。得られた細胞株は、リボヌクレオシドとデオキシヌクレオシドを含まず、選択した 10% ウシ胎児血

グリセリンを添加した $1 \times \text{HEPES}$ 緩衝液を加え室温で 5 分放置した。培地で細胞を洗浄した後、培地交換し、さらに 37°C で 2 日間インキュベートした。細胞を 10 倍に希釈して $1 \text{ mg}/\text{ml}$ の G418 (シグマ社) を含む同培地を用いて 5% CO₂ の存在下で 37°C で、7 日間培養して形質転換細胞を得た。得られた細胞株から培養上清中の HGF 活性の高い細胞を限界希釈法でスクリーニングしヒト HGF 高産生株 BPH 89 を得た。この細胞の培養上清中の HGF 産生能は、230 万単位/ $\text{ml}/\text{日}$ であった。

実施例 3

(1) チャイニーズハムスター CHO 細胞用ヒト HGF 発現ベクターの構築

チャイニーズハムスター CHO 細胞用ヒト HGF 発現ベクター pEVM-T(hHGF II) の構築図は、第 7 図に示す。プラスミド pEVM-T を制限酵素 EcoRV で消化後、細菌性アルカリフォスファターゼ (BAP) でリン酸基を除去した部位に、実施例 2 で得られたプラスミド pBS(h

HGF II) と 1% グルタミンと 50 nM メソトレキセートを含む α -MEM 培地 (フローラボラトリー社) を用いて、培養上清中の HGF 活性の高い細胞を限界希釈法でスクリーニングした。発生したコロニーは、安定なヒト HGF 高産生株を得るために、同培地において 7 世代まで増殖させた。この細胞株は、 100 nM 、 250 nM 、 500 nM 、 750 nM 、および 1000 nM とメソトレキセートの濃度を順次増加させながら同培地で生育させ、さらに安定なヒト HGF 高産生株 EVH 19 を得た。この細胞のヒト HGF 産生能は、310 万単位/ $\text{ml}/\text{日}$ であった。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、RBC1 cDNA の塩基配列を示す。第 2 図は、HBC25 cDNA の制限酵素地図 (a) および HAC19 cDNA の制限酵素地図 (b) を示す。第 3 図は、HBC25 cDNA の塩基配列の一部 (a) 及び HAC19 cDNA の塩基配列の一部 (b) を示す。第 4 図は、ヒト HGF コード領域の全塩基配列とアミノ酸配列を示す。第 5 図は、サル

CCS 複製用ヒト HGF 発現ベクターの構築図を示す。第 6 図は、マウス C127 複製用ヒト HGF 発現ベクターの構築図を示す。第 7 図は、チャイニーズハムスター CHO 複製用ヒト HGF 発現ベクターの構築図を示す。

特許出願人 東洋紡績株式会社

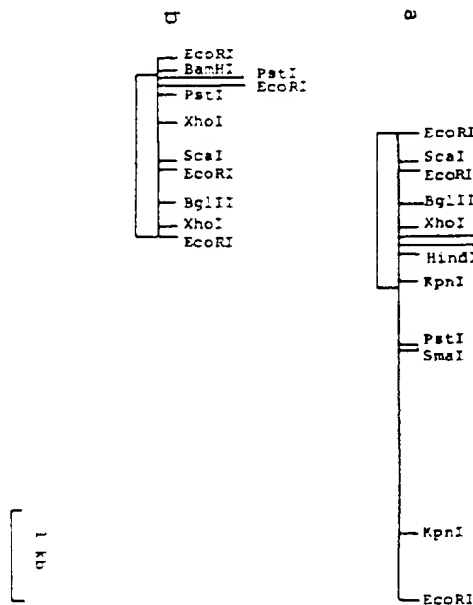
代理人 弁理士 高 島



GAATT CCGTGTGAGG GTTGGGATTC GCACATCCGC -481
 CACACGATCG ACATCACCTG CGAGAACCTG AATGCGAGG ACCTTACAGA AATATATTCG -421
 CGCAATCCGG ATCGGGCTCA ATCCCATCG TCTTTTACCA CTGATCCAAA CATCCGATTT -361
 GGTACTGCT CTCAAAATCG CAATGTGAC GTGTCAAGTG GACAGATTTG TATCTGTGGC -301
 AATGGGAAAA ACTACATGGG CAATCTATCC AATACAGCT CTGGACTGAC ATGTTCATCG -241
 TGGGACAAGA ATATGGAGCA TTACACCTGT CATATCTCTT GGGAGCGAGA GGTATGCAAG -181
 TTGACTAAGA ATTACTGGCG GAACCCGAT GACGACGGCG ATGGACCTTG GTGCTACACA -121
 GGGATCCCTG TCGTTCCTTG GGATTATTCG COTATTTCCC GTTGTCAAGG AGATCTACACA -61
 CCTACAAATG TCAATTTGGA CGATCTGTGA ATATCTGTGT CCAAAACAAA ACAACTCCGA -1
 GTTCTAAATG GCATTCCAAAC ACAACACACA GTAGGCTGGA TGGTTAGTTT GAAATACAGG 60
 AATAACACA TGTGTGGGGG ATCATTTGTA AAGGAAAGTT GGGTTCTTAC TGCAGGCGAA 120
 TGTTTTCCAG CTAGAACAAA AGACTTGAAA GACTATGAGC GTTGGCTTGG AATCCATGAT 180
 GTCCATGAGA GAGGCGAGGA GAAAGCGAAA CAGATCTTAA ACATTTTCCA GGTACTCTAT 240
 GGACCTGAAG GGTGAGATTT GGTTTTACTG AAGCTTGCTG GCGGTGCAAT CTTGGATAAC 300
 TTGTGACGTA CAATTGATTT ACCTAGTTAT GCGTGTACAA TCCCTGAAAA GACTACTTGC 360
 AGTATTACG GGTGGGGCTA CACTGGATTG ATCAACGGAG ATGGTTTATY ACGAGTAGCT 420
 CATCTGTATA TTATGGGGAA TGAGAAATGC AGTCAGCACC ATCAAGGCAA GGTGACTTTG 480
 AATCAGTCTG AATTATGTGC TGGGGCTGAA AAGATTTGAT CAGGACCTTG TGAGCGAGAT 540
 TATGTTGGCC CACTCATTTG TGAACAACAC AATATGAAA TGGTTCTTGG TGTCAATTGT 600
 CCTGGTCTG CATGTGCAAT CCGAAATCGT CCGTGTATTT TTGTTGGAGT AGCATATAT 660
 GCAAAATGGA TACACAAAGT AATTTTGACA TACAACTTGT AATAGCCATA GAAGAGGCCA 720
 GTGATTTTGA AGCATCCATG GATACAGGAA GATTTCCAGC ACTTCAGGAT TAAATGTGCA 780
 CCTAAACAAA TCTTAAACAA ACTACTTGAG TGTGTGAGT GTTCAGATAC TCAATATAT 840
 ATGTGGCGTT TTCTGTGAAA AAAAAAAGAA AAAAAAGAA TTC

第 1 図

第 2 図



AAGCAATC CAGAGGTAGC CTACGAAATC 600
 TGTGACATTC CTCAGTCTTC AGAAGTTGAA TGCATGACCT GCATGAGGGA CAGTTATCGA 660
 GGTCTCATGG ATCATACAGA ATCAGGCAAG ATTTGTGAGG GTTGGGATCA TCGACACAGA 720
 CACCGGCGACA AATTTCTGCG TGAAGATAT CCAGGAGAGG GTTTGATGGA TAATATATCG 780
 GCGATCCCGC ATGGCGAGCG GAGGCGATGG TGCATATCTG TTGAGGCTGA CACCGGCTGG 840
 GAGTACTCTG CAATTAAAC ATGGCTGACG AATAGCTTAA ATGATATCTG TGTTCCTATG 900
 GAAGCAAGTG AATGATCCCA AGCTCAAGGA CAAGGCTTACA GGGGCACTGG CAATACCAT 960
 TCGAATGAAA TTCCATGTCA GCGTTGGGAT TCTCAGTATC CTCACAGGCA TGACATGACT 1020
 COTGAAATTT TCAAGTGCAG GAGCTTACGA GAAATTAAT CCGGAAATCC AGATGGGTCT 1080
 GAATCACCTT GGTGTTTTAC CACTGTGCTA AATCATCCAG TTGGTTACTG CTCCGAAAT 1140
 CCAAACTTAT ATATGTCAAA TGGACAGAT TGTATCTGCT GGAATGGCAA AATATATATG 1200
 GCGAACTTAT CCGAAACAG ATCTGGACTA ACCTGTTCAA TGTGAGCAA GAACATGGAA 1260
 GACTTACAGC GTCATATCTT CTGGGACCA GATGCAAGTA AGCTGAATGA GAATTAATCTG 1320
 CGAATCCAGC ATCATGATGC TCGTGGACCG TCGTGTACCA CCGGAAATCC ACTCATTTCT 1380
 TGGGATATT GCGCTATTTG TCGTTGTGAA GGTGATACCA CACCTACAT AGTCAATTTA 1440
 GACCATCTCT TAATATCTTC GCGCAAAAGC AATCACTGCG GAGTTCTAAA TGGCATTTCA 1500
 ACAGCAACAA ATGTAGGATG GATGATTGCT TTGAGATACA GAAATANACA TATCTGCGGA 1560
 GGTATCTTGA TAAAGGAAGC TTGGGTTGCT ACTGACGAGC AGTGTTCCTC TTCTCGAGAG 1620
 TTGAGAGATT ATGAGGCTTG CTTTCAATTT CATGATCTCC ATGGAAGAGC AGAGGCAAAA 1680
 GCGAAGCAGG TTCTCAATGT TTCCGACCTG GTATATGGCG CTGAAGGATG AGATCTGGTT 1740
 TTAATGAGCC TTGCGAGACC TCGTGTCTCG GATGATTTTG TTAATAGCAT TGATTTACTT 1800
 AATATGATAT GCAGAAATTC TGAAGAGAGC AGTTGCGAGT TTTATGCTTG GGGCTACACT 1860
 GATATGATCA ACTATGATGC TCTATATCCA GTGGCACATC TCTATATAAT CCGAAATGAG 1920
 AATGCGAGCC AGCATCAGCG AGGGAAGCTG ACTCTGAATG AGTCTGAAT ATGTGCTGGG 1980
 GGTGAGAGGA TTGGATCAGG ACCATGTGAG GGGGATATG GTGGGCCACT TGTTTGTGAG 2040
 CAACATAAAA TGCAATGCTT TCTGTGTGTC ATTTGTTCCC GCGCTGGATG CCGCATTTCA 2100
 AATGCTCTCT GTATTTTGT CCGCATAGCA TATTATGCAA AATGGATACA CAATAATATT 2160
 TTAACATATA AGGTACGACA GTCATAGCTG AAGTAACTGT GTCTGAAGCA CCGACCAATA 2220
 CAATCTCTCT TTACATGAGC ATTTCAAGGA ATGTGGAATT AANAATAGCA CTTACACAAA 2280
 TCGTAAGAGA ACTACTGGAG AGTCAATGTT GTTAAATTC TCATTATGCT TTATGCTGCT 2340
 TTCTCTCTGT TTCTTTTCTG AGTGTATATT TGTCAATGTT GAGTGAATTT AAGGTACATG 2400
 CAAGCTGAGT AAGATATCTC CTGAAGATAG TTGATGCAAT TAAANAACAA CACAGCTATA 2460
 ATGCTGGAT TAAATATGAC TAAACATATA ATTAATGCTT ATTTTAACCT CACCAAAACA 2520
 ATTTATACCT TGTGTCTCTT AATTGTAGCG TATATTAAAT TATATTAGAT TCTATATGCT 2580
 ATATGTTATA GTTCATTGAT TTCTCTTCCG CATGATATCT CCAATATCTG TACAGAGACA 2640
 CACTTTTAC AAAACACAT ACCCATCTAC ACATGCTTAG GTACAGATGT ACATGACATA 2700
 CACTTTAAAT TATGATGTAC TTAATGTAACT CTCTAAATAT TTAGAAGTA TGTACCTATA 2760
 GTTTTACCTG AAAAAAATAC AATCTCTTAA AGACAGATAG AATATATATA AATCATCTCA 2820
 AATCAAAAT GACTGGCTAA TTCTGATAC GTAACTGCA GATGATCTTC TGTGCTTGA 2880
 ATTTTACCTG TGGCATCAC CCGGGG

第 3 図(a)

GGATGCG CGAGCGCGTC CAGCAGCAGC
 ATGTGGGTGA CGAAAGCTGT GCGAGCGCGTC GTGCTGGAGC ATGTGCTGCTT GCATGCTGCTC 6L
 CTGCTGCGCA TGGCGATGCG CTATGCGAGC GGACATAGCA AAGAGAGAAA TACAATTGAC 12C
 GAATTCAGAA AATCAGCGAA CACTACCGTA ATCAAAATAG ATCGAGCACT GAAGATAAAA 18C
 ACCAAGAAAG TGAATACTGC AGACCAATGT GCTAATAGAT GTACTAGGAA TAATGGACTT 24C
 CCATTCAGCT CGAAGCGCTT TGTGTTTGT AAGCGAGAAA AGCAATGCTT CTGCTGCGCC 30C
 TTCAATAGCA TGTCAAGTGG AGTGAAGAAA GAATTTGGCC ATCAATTTGA CCTCTATCAA 36C
 AACAAAGACT AGATTAGAAA CTGCAATGAT GGTAAAGGAC CGAGCTACAA GCGAAGCAGTA 42C
 TCTATGACTA AGAGTGGCAT CAAATGTGAG CCGTGGACTT CCATGATAGC ACAGCAAGTC 48C
 AGCTTTTTCG CTGCGAGCTA TCGGGGTAAA GAGCTAGAGC AAAACTACTG TCGAAATGCT 54C
 CGAGCGGAGG AAGGGGAGCC CTGCTGTTTC ACAGGCAATC CAGAGGTAGC CTAGCAATGC 60C
 TGTGACATTC CTGAGTGTTC AGAAGTTGAA TGCATGACCT CCAATGGGGA GAGTTATGCA 66C
 GGTCTCATGC ATCATACAGA ATCAGGCAAG ATTTCTGAGC CCGCGGATCA TGAAGACGCA 72C
 CAGCGGACAA AATTCTTGCC TGAAGATAT CCGGACAGG CTTTGTATGA TAATTATTCG 78C
 CGCAATCGCG ATGCGGAGCC GAGGCGATGC TGTATATCT TGAAGCTGCA CAGCGCGTGC 84C
 GAGTACTGTC GATTAAGAC ATGCGCTGAC AATACTGTAA ATGACTACTA TGTTCCTATC 90C
 GAAAGCACTG AATGATGCA AGGTCAAGGA GAAGGTGACA GGGGCACTGC CAATACGATT 96C
 TGGATGGAAT TTGATGTGCA GCGTTGGGAT TGTGATGAT CTGCAAGGCA TGACATGACT 102C
 CCGTCAAAAT TCAAGTGCAA GGACCTAGCA GAAATTAAT CCGGAAATGC AGATGGGCTT 108C
 GAATCAAGCT GGTGTTTAC CAGCTATGCA AAGATCGGAG TTGCTTACTG CTGCGAAATT 114C
 CGAACTGTGT ATATGTGAAA TGGACAGAT TGTATGCTG GGAATGGCAA AATTTATATG 120C
 GCGAAGCTAT GCGAAGCAAG ATCTGGACTA AGCTGTTCAA TGTGCAAGCA GACATGCAA 126C
 GAGTACAGCC GTGATATGTT CTGGGAACCA GATGCAAGTA AGCTGAATGA GAATTAAGTC 132C
 CGAAATCGAC ATGATGATGC TGAATGAGCC TGGTGTGATA CGGGAAATGC AGTCATTCCT 138C
 TGGGATTATT GCGTATTTTC TCGTTGTGAA GGTGATAGCA CAGCTACAT AGTCAATTTA 144C
 GACCATGCTC TAATATCTTG CCGCAAAAGC AAAGCACTGC GAGTTGTAAA TGGGATTCGA 150C
 ACAGCAACAA ATGTGGATG GATGATTAGT TTGACATACA GAAATAAACA TATCTCGGCA 156C
 GGTATGTTGA TAAAGGAAAG TTGGGTTCTT ACTGCAAGAC AGCTGTTGCG TTCTCGAGAC 162C
 TTGAAGATT ATCA

第3図

第4図 (4)
 TAT GAT GGT GTC TTA GCG GTC GCA GAT GTC TAT ATA ATC GCA GAT GTC 190
 Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Cys Asn Glu
 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725
 AAA TGC GGC GAG CAT GTC GCA GCG GAG GTC ACT CTC GAT GAT GTC GAT 198
 Lys Ala Ser Glu His Ala Cys Lys Val Thr Leu Asn Ala Glu Ser Glu
 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725
 ATA TGT GGT GGC GGT GTC GAT GTC GAT GTC GAT GTC GAT GTC GAT GTC 206
 Ile Cys Ala Cys Glu His Lys Ile Cys Glu Cys Glu Cys Glu Cys Glu
 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725
 TAT GGT GGC GGC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC 2064
 Tyr Glu Cys Pro Leu Val Cys Glu His Lys Met Arg Met Val Leu
 695 700 705 710 715 720 725
 GGT GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC 2112
 Gly Met Ile Val Pro Cys Glu His Ile Cys Glu His Arg Pro Glu
 700 705 710 715 720 725
 ATT TTT GTC GCA GTC GAT TAT GCA AAA TGG ATA GAT AAA ATT GTT 2160
 Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Ala Lys Thr Ile His Lys Ile
 705 710 715 720 725
 TTA GCA TAT AGC GTC GCA GTC TCA TAC 725
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Glu Ser Asn

第4図 (1)

ATC TGC CTC ACC AAA CTC CTC CCA GCG CTC CTC CAG CAT GTC CTC 48
 Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Phe Ala Leu Leu Leu Glu His Val Leu
 1 5 10 15
 CTC GAT CTC CTC CTC CTC GCG ATC GCG ATC GCG TAT GCA GAG GCA CAT 96
 Leu Val Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Cys His
 20 25 30 35
 AAG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAC GAA TTC AAA TCA GGA AAG ACT 144
 Lys Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Cys Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
 35 40 45 50 55 60 65
 ACC CTA ATC AAA ATA GAT CCA CCA CTC AAG ATA AAA ACC AAA AAA CTC 192
 Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
 50 55 60 65
 AAT ACT GCA GAC CAA TGT GGT AAT AGA TGT ACT AGG AAT AAT GCA GTT 240
 Asn Thr Ala Asp Glu Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Asn Gly Leu
 65 70 75 80 85
 GCA TTC ACT TGC AAG GCG TTT GTT TTT GAT AAA GCG AGA AAA CAA TCC 288
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Glu Cys
 85 90 95 100 105 110 115
 CTC TGC TTC GCG TTC AAT AGC ATC TCA AGT GCA CTC AAG AAA GAA TTT 336
 Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
 100 105 110 115 120 125 130 135
 GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA AAG AAA GAC TAC ATT AGA AAG TGC 384
 Gly His Glu Phe Asn Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225
 ATC ATC GGT AAA GGA GCG AGC TAC AAG GGA ACA GTA TCT ATC ACT AAG 432
 Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225
 ACT GCG ATC AAA TGT CAG GCG TGC AGT TGC ATC ATA CCA CAC GAA CTC 480
 Ser Gly Ile Lys Cys Glu Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu Leu
 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225
 AGC TTT TTC GGT TGC AGC TAT GCG GGT AAA GAC GTA CAG GAA AAG TAC 528
 Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asn Leu Glu Glu Asn Tyr
 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225
 TGT GCA AAT GGT GCA GCG GAA GAA GCG GCA GCG TGC TGT TTC ACA AGC 576
 Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225
 AAT GCA GAC GTA CCG TAC GAA GTC TGT GAC ATT GGT CAG TCT TCA GAT 624
 Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asn Ile Pro Glu Cys Ser Glu
 195 200 205 210 215 220 225

第4図 (2) (3)

第4図(2)

CYT CAA TCC ATC ACC TGC AAT GCG CAC ACT TAT CCA GGT CTC ATC CAT	672		
Val Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp			
210	215	220	
CAT ACA GAA TCA GGC AAC ATT TGT CAG CCG TGC GAT CAT CAG ACA CCA	720		
His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Glu Arg Trp Asn His Glu Thr Pro			
225	230	235	240
CAC CCG CAC AAA TTC TTS CCT GAA AGA TAT CCG CAC AAC GCG TTC CAT	762		
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asn Lys Gly Phe Asp			
245	250	255	
GAT AAT TAT TCC CCG AAT CCG GAT GCG CAC CCG AGC CCA TGG TGC TAT	816		
Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro Arg Pro Trp Cys Tyr			
260	265	270	
ACT GTT GAC CCT CAC ACC CCG TCG GAG TAC TGT CCA ATT AAA ACA TCC	864		
Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys His Ile Lys Thr Cys			
275	280	285	
GCT GAC AAT ACT GTA AAT GAT ACT GAT GTT CTT ATG GAA ACA ACT GAA	912		
Ala Asp Asn Thr Val Asn Asp Thr Asp Val Pro Met Glu Thr Thr Glu			
290	295	300	
TGC ATC CAA GGT CAA CGA GAA GCG TAC AGG GGC ACT CCG AAT ACC ATT	960		
Cys Ile Glu Gly Glu Gly Glu Tyr Arg Gly Thr Asn Asn Thr Ile			
305	310	315	320
TGC AAT CCA ATT CCA TGT CAC CCG TCG GAT TCT CAG TAT CCT CAC AAG	1008		
Trp Asn Gly Ile Pro Cys Glu Arg Trp Asn Ser Glu Tyr Pro His Lys			
325	330	335	
CAT CAC ATC ACT CCT CAA AAT TTC AAG TGC AAC CAC CTA CCA GAA AAT	1056		
His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn			
340	345	350	
TAC TCG GAA AAT CCA GAT CCG TCT GAA TCA CCG TCG TCT TTT ACC ACT	1104		
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr			
355	360	365	
GAT CCA AAC ATC CCA GTT GGT TAC TCG TCC CAA ATT CCA AAC TGT GAT	1152		
Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Glu Ile Pro Asn Cys Asp			
370	375	380	
ATG TCA AAT CCA CAA GAT TGT TAT CCG CCG AAT GCG AAA AAT TAT ATG	1200		
Met Ser Asn Gly Glu Asn Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met			
385	390	395	400
GCG AAC TTA TCC CAA ACA ACA TCT CCA CTA ACC TGT TCA ATC TCG AAC	1248		
Gly Asn Leu Ser Glu Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asn			
405	410	415	

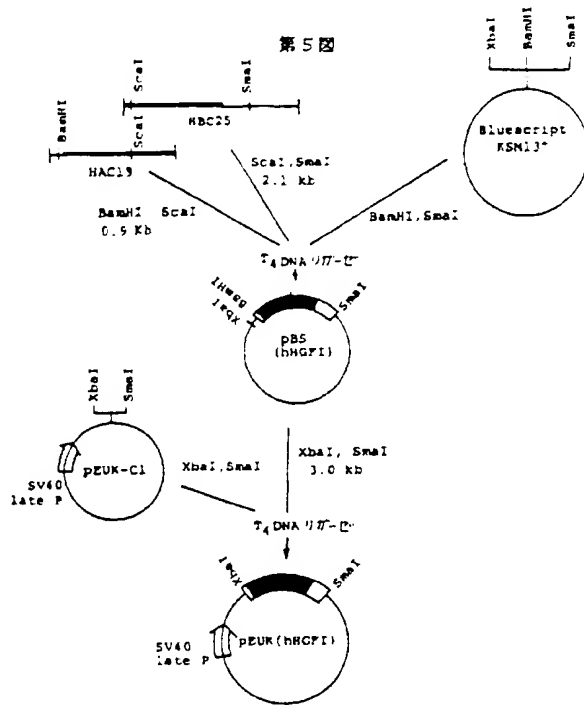
第4図(3)へ続く

第4図(3)

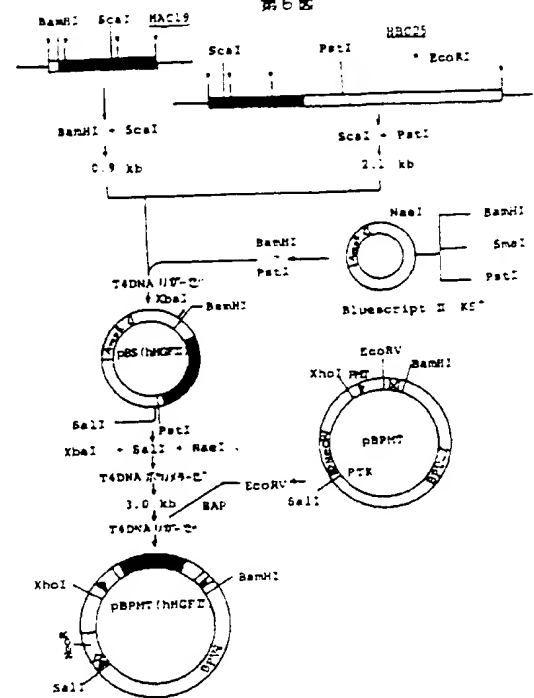
AAC AAC ATC GAA CAC TTA CAC CCT CAT ATC TTC TCC GAA CCA GAT CCA	1296		
Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala			
420	425	430	
AGT AAC CTC AAT CAG AAT TAC TGC CCA AAT CCA GAT CAT GAT CCG CAT	1344		
Ser Lys Leu Asn Cys Asn Thr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asn Ala His			
435	440	445	
GGA CCG TCG TGC TAC ACC CCA AAT CCA CTC ATT CCG TCG CAT TAT TCC	1392		
Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys			
450	455	460	
CCT ATT TCT CCT TGT GAA GGT GAT ACC ACA CCT ACA ATA GTC AAT TTA	1440		
Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu			
465	470	475	480
GAC GAT CCT GTA ATA TCT TCC GCG AAA ACC AAA CAA CTC CCA GTT GTA	1488		
Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Glu Leu Arg Val Val			
485	490	495	
AAT GCG ATT CCA ACA CCA ACA AAT CTA CCA TCG ATC ATT ACT TTC AGA	1536		
Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Val Gly Trp Met Ile Ser Leu Arg			
500	505	510	
TAC ACA AAT AAA CAT ATC TCC CCA CCA TCA TTC ATA AAC CAA ACT TCC	1584		
Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp			
515	520	525	
GTG CTT ACT CCA CCA CAC TGT TTC CCT TCT CCA GAC TTC AAA GAT TAT	1632		
Val Leu Thr Ala Arg Glu Cys Phe Pro Ser Arg Asn Leu Lys Asp Tyr			
530	535	540	
CAG CCT TCG CTT GGA ATT CAT GAT CTC CAT CCA ACA CCA GAG GAG AAA	1680		
Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Glu Glu Lys			
545	550	555	560
GCG AAA CAG GTT CTC AAT GTT TCC CAC CTC GTA TAT GCG CCG GAA CCA	1728		
Arg Lys Glu Val Leu Asn Val Ser Glu Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly			
565	570	575	
TCA GAT CTC GTT TTA ATC AAC CTT GCG AGA CCT CCT CTC CTC GAT GAT	1776		
Ser Asn Leu Val Leu Met Lys Leu His Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp			
580	585	590	
TTT GTT AAT ACA ATT GAT TTA CCT AAT TAT CCA TCG ACA ATT CCG GAA	1824		
Phe Val Asn Thr Ile Asn Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu			
595	600	605	
AAC ACC ACT TCC ACT GTT TAT GCG TCG GCG TAC ACT CCA TTC ATC AAC	1872		
Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn			
610	615	620	

第4図(4)へ続く

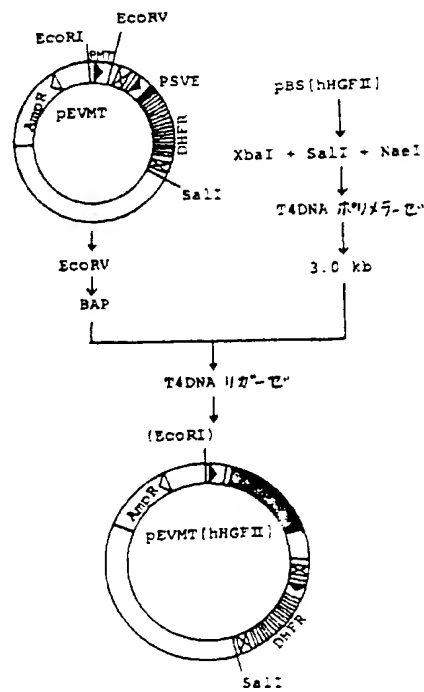
第5図



第6図



第7図



第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 13/00		8619-4H
C 12 N 5/10		
	ZNA	
// A 61 K 37/02	ACS	8615-4C
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:91)		

⑥発明者 下 西 学 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬研究所内

⑦発明者 清 水 伸 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬研究所内

手続補正書 (自発)

平成1年8月4日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成1年特許願第142697号

2. 発明の名称

組換えヒト肝実質細胞増殖因子

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 東洋紡績株式会社

4. 代 理 人 ⑤541

住所 大阪市中央区平野町三丁目3番9号

(橋本ビル)

高島国際特許事務所

電.(06) 227-1156

氏名 弁理士 (8079) 高 島

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄および

図面 方 式



6. 補正の内容

(1) 明細書第22頁第1行の「0.5」を「0.1」に訂正する。

(2) 明細書第22頁第2行の「134g/dl」を「1g/dl」に訂正する。

(3) 明細書第22頁第4行の「85000G」を「85000g」に訂正する。

(4) 明細書第22頁第5行の「22℃」を「20℃」に訂正する。

(5) 明細書第22頁第8～12頁の「得られたRNA・・・溶解した。」を「得られたRNAを1mM EDTAを含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5) (以後、TE緩衝液と略する) 0.5mlに溶解し、65℃、5分加熱処理した後、1M NaCl溶液0.5mlを加えた。」に訂正する。

(6) 明細書第24頁第4および8行の「STB」をそれぞれ「STE」に訂正する。

(7) 明細書第28頁下から第4行の「1～0.1%」を「0.1%」に訂正する。

ATC TGC GTC ACC AAA CTC CTC GCA GGC CTC CTC GAG CAT CTC CTC	45
Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu	
5	10
CTC CAT CTC CTC CTC CTC GGC ATC GGC ATC GGC TAT GCA GAG GGA CAT	96
Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Gln Gln His	
20	25
AAG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAC GAA TTC AAA AAA TCA GCA AAG ACT	144
Lys Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Gln Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr	
35	40
ACC CTA ATC AAA ATA GAT CCA GCA CTC AAG ATA AAA ACC AAA AAA CTC	192
Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val	
50	55
AAT ACT GCA GAC CAA TGT GGT AAT AGA TGT ACT AGG AAT AAT GCA GTT	240
Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asp Arg Cys Thr Arg Asn Asn Gln Leu	
65	70
GCA TTC ACT TGC AAG GGC TTT GTT TTT GAT AAA GCG AGA AAA GAA TCC	288
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys	
85	90
CTC TGC TTC GGC TTC AAT AGC ATG TCA ACT GCA CTC AAG AAA GAA TTT	336
Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Gln Phe	
100	105
GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA AAC AAA GAC TAC ATT AGA AAC TGC	384
Gly His Gln Phe Asp Leu Tyr Gln Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Gln	
115	120
ATC ATC GGT AAA GCA GGC AGC TAC AAC GGA ACA GTA TCT ATC ACT AAG	432
Ile Ile Gln Lys Gln Arg Ser Tyr Lys Gln Thr Val Ser Ile Thr Lys	
130	135
ACT GGC ATC AAA TGT CAC GGC TGC AGT TCC ATG ATA GCA GAC GAA GAC	480
Lys Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Gln His	
145	150
AGC TTT TTC GGT TGC AGC TAT GGC GGT AAA GAC CTA GAC GAA AAC TAC	528
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Gln Asn Tyr	
160	165
TGT CGA AAT GGT GCA GGC GAA GAA GGC GCA GGC TGC TGT TTC ACA AGC	576
Cys Arg Asn Pro Arg Gly Gln Gln Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser	
180	185
AAT CGA GAC GTA GGC TAC GAA GTC TGT GAC ATT GCT GAG TGT TCA GAA	624
Asn Pro Gln Val Arg Tyr Gln Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Gln	
195	200

第4図(2)へ続く

GTT GAA TGC ATC ACC TGC AAT GGC GAG ACT TAT CGA GGT CTC ATC GAT	672
Val Gln Cys Met Thr Cys Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp	
210	215
CAT ACA GAA TCA GGC AAG ATT TGT CAG GGC TGC GAT CAT CAG ACA CCA	720
His Thr Gln Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr	
225	230
CAC GGC CAC AAA TTC TTC GGT GAA ACA TAT CCC GAC AAG GGC TTT GAT	768
His Arg His Lys Phe Leu Pro Gln Arg Tyr Pro Asp Lys Gln Phe Asp	
245	250
GAT AAT TAT TGC GGC AAT CCC GAT GGC CAG GGC AGC CCA TGC TGC TAT	816
Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr	
260	265
ACT GTT GAC GCT CAC ACC GGC TGC GAG TAC TGT GCA ATT AAA ACA TGC	864
Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Gln Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys	
275	280
GCT GAC AAT ACT GTA AAT GAT ACT GAT GGT GGT ATG GAA ACA ACT CAA	912
Ala Asp Asn Thr Val Asn Asp Thr Asp Val Pro Met Gln Thr Thr Gln	
290	295
TGC ATC GAA GGT GAA GGA GAA GGC TAC AGC GGC ACT GGC AAT ACC ATT	960
Cys Ile Gln Gln Gln Gln Gln Tyr Arg Gly Thr Ala Asn Thr Ile	
305	310
TGC AAT GGA ATT CCA TGT CAG GGT TGC GAT TGT CAG TAT GGT CAC AAC	1008
Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Lys	
325	330
CAT GAC ATC ACT GGT GAA AAT TTC AAG TGC AAG GAC CTA CCA GAA AAT	1056
His Asp Met Thr Pro Gln Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Gln Asn	
340	345
TAC TGC CGA AAT CGA GAT GGC TGT GAA TCA CCC TGC TGT TTT ACC ACT	1104
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Gln Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr	
355	360
GAT CCA AAC ATC CGA GGT GGT TAC TGC TGC CAA ATT CCA AAC TGT CAT	1152
Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp	
370	375
ATC TCA AAT GGA GAA GAT TGT TAT GGT GGC AAT GGC AAA AAT TAT ATC	1200
Met Ser Asn Gln Gln Act Cys Tyr Arg Gly Asp Gly Lys Asn Tyr Met	
385	390
GGC AAC TTA TGC CAA ACA AGA TGT GCA CTA ACR TGT TCA ATC TGC AAC	1248
Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asn	
405	410

第4図(2)へ続く

第4図D: AAG AAC ATG GAA GAC TTA GAC GGT GAT ATC TTC TCG GAA GCA GAT GCA 1296
 Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala
 420 425 430

AGT AAG CTC AAT GAC AAT TAT TCG GCA AAT CCA GAT GAT GAT GGT GAT 1344
 Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His
 435 440 445

GCA GCG TCG TAC ACC GCA AAT GCA CTC ATT GGT TCG GAT TAT TCG 1392
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys
 450 455 460

CGT ATT TCT CGT TGT GAA GGT GAT ACC ACA GGT ACA ATA CTC AAT TTA 1440
 Pro Ile Ser Arg Cys Gly Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 465 470 475

GAC GAT CCG GTA ATA TCT TCG GCC AAA ACC AAA GAA CTC GCA GGT GTA 1488
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Glu Leu Arg Val Val
 485 490 495

AAT GCG ATT CCA ACA GCA ACA AAT GTA GGA TCG ATC ATT AGT TTG AGA 1536
 Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Val Glu Trp Met Ile Ser Leu Arg
 500 505 510

TAC ACA AAT AAA CAT ATC TCG GCA GCA TCA TTG ATA AAG GAA AGT TCG 1584
 Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp
 515 520 525

GTT CTT ACT GCA CGA CAG TGT TTC GGT TCT GCA GAC TTC AAA GAT TAT 1632
 Val Leu Thr Ala Arg Glu Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr
 530 535 540

GAG GCT TCG CTT GCA ATT CAT GAT GTC CAT GGA AGA GCA GAG GAC AAA 1680
 Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Glu Arg Gly Glu Glu Lys
 545 550 555 560

CGC AAA CAG GTT CTC AAT GGT TCG CAG CTC GTA TAT GGC GCT GAA GCA 1728
 Arg Lys Glu Val Leu Asn Val Ser Glu Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly
 565 570 575

TCA GAT CTG GTT TTA ATC AAG GGT GGC AGA GCT GCT GTC CTC GAT GAT 1776
 Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp
 580 585 590

TTT GTT AAT ACA ATT CAT TTA CCG AAT TAT GGA TCG ACA ATT GCT GAA 1824
 Phe Val Asn Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu
 595 600 605

AAG ACC AGT TCG AGT GGT TAT GGC TCG GCG TAC ACT GCA TTG ATC AAC 1872
 Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn
 610 615 620

第4図(4)へ続く

手続補正書 (自発)

平成1年10月26日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成1年特許願第142697号

2. 発明の名称

超換ヒト肝実質細胞増殖因子

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 東洋紡績株式会社

氏名 中村 敏一

4. 代理人 ㊦541

住所 大阪市中央区平野町三丁目3番9号

(編大ビル)

五 (06) 227-1156

高島国際特許事務所

氏名 弁護士 (8079) 高島 一



5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄および

「要約」方式 表式 ㊦

6. 補正の内容

(1) 明細書第3頁最下行の「血小板」を「血小板などの組織」に訂正する。

(2) 明細書第4頁第8行の「肝組織あるいは血小板など」を「肝臓、脾、肺臓、骨髄、心臓、胎盤、腎臓などの臓器あるいは血小板や白血球などの血液細胞など」に訂正する。

(3) 明細書第5頁第8行の「見出した。」の後に「また、ヒトの肝臓以外の臓器や血液細胞のcDNAライブラリーよりヒトHGF cDNAが得られることも見出した。」を加入する。

(4) 明細書第5頁第4行の「mRNA」の後に「または染色体DNA」を加入する。

(5) 明細書第6頁第5行の「cDNAライブラリー」の後に「または染色体DNAライブラリー」を加入する。

(6) 明細書第6頁第6～7行の「ラット」を「動物、例えばラットの」に訂正する。

(7) 明細書第6頁第7行の「cDNA」の後に「または染色体DNA」を加入する。

(8) 明細書第6頁第7～8行の「ラット由来」を「動物、例えばラット由来の」に訂正する。

(9) 明細書第6頁第8行の「cDNAライブラリー」の後に「または染色体ライブラリー」を加える。

(10) 明細書第6頁第9行の「cDNA」の後ろに「または染色体DNA」を加える。

(11) 明細書第6頁第10行の「ラット由来」を「動物、例えばラット由来の」に訂正する。

(12) 明細書第6頁第10行の「cDNA」の後ろに「または染色体DNA」を加える。

(13) 明細書第6頁第11行の「ヒト肝mRNA」を「ヒトの臓器あるいは血液細胞などのmRNA」に訂正する。

(14) 明細書第6頁第14行の「抽出する。」の後に「また、本発明によって明らかにされたDNA配列あるいはヒトや動物のHGFのアミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドや本発明により得られたヒトHGF cDNAやヒトHGF染色体DNAなどをプローブに用い、またヒ

トまたは動物のHGFに対する抗体を用い、直接ヒトの臓器あるいは血液細胞などから抽出したmRNAより調製したcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローンより目的とするヒト由来のHGFのcDNAを抽出することもできる。」を加える。

(15) 明細書第7頁第6行の「ラット」を「動物、例えばラット」に訂正する。

(16) 明細書第7頁第7行の「ラット巨核球細胞、ラットまたはヒト肝組織」を「ラットなどの動物またはヒトの肝臓、腎臓、心臓、肺臓、脳、骨髄、胎盤などの臓器あるいは白血球、巨核球やリンパ球などの血液細胞」に訂正する。

(17) 明細書第7頁第10～11行の「ラット巨核球細胞、またはラットもしくはヒト肝組織」を「ラットなどの動物またはヒトの臓器あるいは血液細胞」に訂正する。

(18) 明細書第7頁第16行の「ヒト肝mRNA」を「ヒト肝、脳、胎盤、白血球などのmRNA」に訂正する。

(19) 明細書第7頁第19行の「逆転写酵素」の後に「やポリメラーゼ・チェーン・リアクション法(PCR)」を挿入する。

(20) 明細書第8頁第3行の「1983」の後に「あるいはM. A. Frohman らの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998, 1988)」を加える。

(21) 明細書第9頁最下行～第10頁第1行の「ラット」を「ラットなどの動物またはヒトの」に訂正する。

(22) 明細書第10頁第12行の「ラット由来」を「ラットなどの動物またはヒト由来の」に訂正する。

(23) 明細書第11頁第1行の「ラット由来」を「ラットなどの動物またはヒト由来の」に訂正する。

(24) 明細書第11頁第3行の「ヒト肝由来」を「ヒトの臓器あるいは血液細胞由来の」に訂正する。

(25) 明細書第11頁第5～6行の「ラットあるいはヒト由来」を「ラットなどの動物あるいはヒ

ト由来の」に訂正する。

(26) 明細書第14頁第6～7行の「SV40プロモーター、HSV1 TKプロモーター」を「SV40プロモーターやHSV1 TKプロモーターあるいはノタロチオネインプロモーターやヒートショックプロモーター」に訂正する。

(27) 明細書第30頁第18行の次に以下の記載を加える。

「第4図に示すヒトHGFのアミノ酸配列をコンピュータによりホモロジー検索を行った結果、ヒトHGFはプラスミノーゲン、プラスミン、カリキレインや凝固因子Ⅱなどのセリンプロテアーゼとホモロジーをもつことが見出された。即ち、ヒトHGFはそのα-鎖にクリングル構造と推定される配列を4箇所持っており、またそのβ-鎖は上記セリンプロテアーゼのプロテアーゼ領域に類似している。しかし、セリンプロテアーゼの活性中心と推定されているSerとHisがヒトHGFのβ-鎖ではTyr(676番目)とGln(535番目)にそれぞれ置換されている。」

(28) 明細書第33頁最下行の「プラスミドpBS(hHGFII)」を「プラスミドpBS(hHGFII) (微工研国寄第11050号)」に訂正する。

(29) 明細書第34頁第3～4行の「プラスミドpBS(hHGFII)」を「プラスミドpBS(hHGFII) (微工研国寄第11050号)」に訂正する。

(30) 明細書第36頁最下行～第37頁第1行の「プラスミドpBS(hHGFII)」を「プラスミドpBS(hHGFII) (微工研国寄第11050号)」に訂正する。

(31) 別紙の通り、受託証を提出する。

7. 添付書類の目録

(1) 受託証(写) 1 通